

Kits de tipificación de HLA

Instrucciones de uso

Amplificación PCR y secuenciación de locus HLA clase I y II

Número de versión: 1.4

Fecha de publicación: 27 de mayo de 2020

IVD



CareDx Pty
20 Collie St.
Fremantle 6160
Australia Occidental
Australia



Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
Bélgica

Contenido

PRINCIPIO	3
USO PREVISTO	3
COMPOSICIÓN DEL KIT	4
REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO	9
MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS NO SUMINISTRADOS	10
REQUISITOS DE MUESTREO	11
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DE SEGURIDAD	12
SÍMBOLOS	12
PROCEDIMIENTO	13
1. PCR	13
2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	13
3. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO PCR	14
4. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	15
5. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	17
6. DESNATURALIZACIÓN Y ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	17
7. EDICIÓN Y ANÁLISIS DE ELECTROFEROGRAMAS	18
CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO	20
PRECISIÓN	20
LÍMITE DE DETECCIÓN	21
ESPECIFICIDAD.....	21
SUSTANCIAS INTERFERENTES	21
LIMITACIONES Y PRECAUCIONES	23
LICENCIA	23
BIBLIOGRAFÍA	24
RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	25
PRODUCTOS RELACIONADOS	28
OLERUP SBT™ HARPS®	28
INFORMACIÓN DE CONTACTO	29

Principio

El procedimiento de tipificación basada en secuenciación (SBT) de HLA que se describe en este documento fue desarrollado originalmente por D. Sayer en 2001¹ y se desarrolló en un ensayo de un solo tubo en 2004². El procedimiento supone la amplificación inicial de la secuencia objetivo seguida de un tratamiento enzimático para eliminar cebadores y dNTP no incorporados. Luego se utiliza el amplicón como plantilla para la secuenciación directa y automatizada de ADN fluorescente, con cebadores de secuenciación personalizados y el método químico de secuenciación Big Dye[®] Terminator Applied Biosystems™ de Life Technologies™. Los productos de extensión se purifican con el método de precipitación de etanol y se desnaturaliza con formamida Hi-Di™ Applied Biosystems™ de Life Technologies™, antes de la separación y la detección en el secuenciador automatizado de ADN fluorescente. Se recomienda analizar los datos resultantes con el software de análisis de secuencias ASSIGN™ SBT de CareDx Pty Ltd³⁻⁵.

Uso previsto

Los kits de SBT de HLA OLERUP SBT™ de CareDx Pty Ltd se utilizan en la tipificación de genes HLA clase I (HLA-A, B y C) y clase II (HLA-DRB1, DQB1 y DPB1) en un entorno de laboratorio de ADN genómico. Cada kit contiene reactivos que facilitan la amplificación de PCR y la secuenciación del ADN de un determinado gen. Los datos de secuenciación resultantes se interpretan a través del software de SBT ASSIGN™ de CareDx Pty Ltd. Debe señalarse que estos kits de SBT no se utilizan para el diagnóstico de enfermedades, pero pueden utilizarse como parte del proceso de determinación de compatibilidad entre donantes y receptores. Se trata de una prueba de secuenciación de ADN que produce una secuencia de ADN de parte de un gen HLA. El dispositivo está dirigido a personal con las cualificaciones adecuadas y con conocimiento de la frecuencia de los tipos de HLA en su población. Las pruebas deben realizarse en laboratorios regulados.

Composición del kit

Kit	Nro. de catálogo		Contenido pre PCR [†] (Cant. de ampollas)	Contenidos pos PCR (Cant. de ampollas)	
Clase I					
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 pruebas	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MEZCLA</div>	1 x 25  L 1 x 352  L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 44  L cada uno
	XH-PD1.1-2(50)	50 pruebas	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MEZCLA</div>	1 x 60  L 1 x 880  L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 110  L cada uno
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 pruebas	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MEZCLA</div>	1 x 25  L 1 x 352  L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 44  L cada uno
	BS-PD2.1-2(50)	50 pruebas	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">ADN POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MEZCLA</div>	1 x 60  L 1 x 880  L <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 110  L cada uno

Kit	Nro. de catálogo		Contenido pre PCR ⁺ (Cant. de ampollas)		Contenidos pos PCR (Cant. de ampollas)		
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 pruebas	<div data-bbox="862 475 1115 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ADN POL – HLA-C</div> <div data-bbox="862 528 1032 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MEZCLA</div>	1 x 25 μ L 1 x 352 μ L	<div data-bbox="1330 475 1480 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1F</div> <div data-bbox="1330 528 1480 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2F</div> <div data-bbox="1330 580 1480 622" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3F</div> <div data-bbox="1330 633 1480 675" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4F</div> <div data-bbox="1330 686 1480 727" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5F</div> <div data-bbox="1330 738 1480 780" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6F</div> <div data-bbox="1330 791 1480 833" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX7F</div>	<div data-bbox="1503 475 1653 517" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1R</div> <div data-bbox="1503 528 1653 569" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2R</div> <div data-bbox="1503 580 1653 622" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3R</div> <div data-bbox="1503 633 1653 675" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4R</div> <div data-bbox="1503 686 1653 727" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5R</div> <div data-bbox="1503 738 1653 780" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6R</div>	1 x 44 μ L cada uno
	HH-PD 3.2-2(50)	50 pruebas	<div data-bbox="862 954 1115 995" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ADN POL – HLA-C</div> <div data-bbox="862 1007 1032 1048" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MEZCLA</div>	1 x 60 μ L 1 x 880 μ L	<div data-bbox="1330 954 1480 995" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1F</div> <div data-bbox="1330 1007 1480 1048" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2F</div> <div data-bbox="1330 1059 1480 1101" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3F</div> <div data-bbox="1330 1112 1480 1153" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4F</div> <div data-bbox="1330 1165 1480 1206" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5F</div> <div data-bbox="1330 1217 1480 1259" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6F</div> <div data-bbox="1330 1270 1480 1311" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX7F</div>	<div data-bbox="1503 954 1653 995" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX1R</div> <div data-bbox="1503 1007 1653 1048" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX2R</div> <div data-bbox="1503 1059 1653 1101" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX3R</div> <div data-bbox="1503 1112 1653 1153" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX4R</div> <div data-bbox="1503 1165 1653 1206" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX5R</div> <div data-bbox="1503 1217 1653 1259" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CEX6R</div>	1 x 110 μ L cada uno

Kit	Nro. de catálogo		Contenido pre PCR ⁺ (Cant. de ampollas)		Contenidos pos PCR (Cant. de ampollas)	
Clase II						
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 pruebas	ADN POL – DRB1 MEZCLA DE	1 x 10 μ L 1 x 370 μ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1 x 44 μ L cada uno
	HH-PD5.2-5(50)	50 pruebas	ADN POL – DRB1 MEZCLA DE	1 x 20 μ L 1 x 920 μ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1 x 110 μ L cada uno
	LG-PD5.2-7(20)	20 pruebas	ADN POL – DRB1 MEZCLA DE	1 x 10 μ L 1 x 370 μ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 44 μ L cada uno
	LG-PD5.2-7(50)	50 pruebas	ADN POL – DRB1 MEZCLA DE	1 x 20 μ L 1 x 920 μ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 110 μ L cada uno

Kit	Nro. de catálogo		Contenido pre PCR ⁺ (Cant. de ampollas)		Contenidos pos PCR (Cant. de ampollas)		
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 pruebas	ADN POL – DQB1 MEZCLA DE	1 x 10 µL 1 x 370 µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 44 µL cada uno
	PQ-PD6.2-2(50)	50 pruebas	ADN POL – DQB1 MEZCLA DE	1 x 20 µL 1 x 920 µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 110 µL cada uno
	AN-PD6.2-3(20)	20 pruebas	ADN POL – DQB1 MEZCLA DE	1 x 10 µL 1 x 370 µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44 µL cada uno
	AN-PD6.2-3(50)	50 pruebas	ADN POL – DQB1 MEZCLA DE	1 x 20 µL 1 x 920 µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110 µL cada uno
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 pruebas	ADN POL – DPB1 MEZCLA DE	1 x 10 µL 1 x 370 µL	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 44 µL cada uno
	HH-PD10.1(50)	50 pruebas	ADN POL – DPB1 MEZCLA DE	1 x 20 µL 1 x 920 µL	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 110 µL cada uno

Kit	Nro. de catálogo	Σ	Contenido pre PCR [†] (Cant. de ampollas)		Contenidos pos PCR (Cant. de ampollas)		
	KD-PD10.2-1(20)	20 pruebas	ADN POL – DPB1 MEZCLA DE	1 x 10 μ L 1 x 370 μ L	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1 x 44 μ L cada uno
	KD-PD10.2-1(50)	50 pruebas	ADN POL – DPB1 MEZCLA DE	1 x 20 μ L 1 x 920 μ L	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1 x 110 μ L cada uno

[†]El kit pre PCR contiene una ampolla de una mezcla de PCR específica del locus (por ejemplo, **MEZCLA DE**) que consiste en un tampón de PCR, dNTP, MgCl₂ y cebadores de PCR específicos del locus, junto con una única ampolla de ADN polimerasa (por ejemplo, **ADN POL – HLA-**).

El kit pos PCR contiene cebadores de secuenciación (por ejemplo, **AEX1F**).

Requisitos de almacenamiento

Las cajas pre y pos PCR pueden separarse y almacenarse en congeladores designados como pre y pos PCR. Cuando se almacenan a -20 °C (se acepta un rango de temperatura de -15 °C a -25 °C), los componentes del kit pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada en los contenedores externos del kit, y se toleran hasta 25 ciclos de congelamiento/descongelamiento.

La prueba de estabilidad acelerada para los kits de HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 y DPB1 indicó una vida útil de dos años y medio desde la fecha de fabricación a una temperatura de almacenamiento de -20 °C. Se completó una prueba confirmatoria en tiempo real. No usar más allá de la fecha de caducidad.

Para mantener un rendimiento óptimo del kit, sus componentes deben sacarse del lugar de almacenamiento a -20 °C y descongelarse rápidamente a temperatura ambiente antes de su uso. Los componentes del kit, a excepción de la polimerasa, deben mezclarse en vórtex suavemente para garantizar que los componentes de cada tubo se mezclen adecuadamente después de descongelarse. Después del uso, los kits o los componentes deben volverse a almacenar inmediatamente a -20 °C.

Materiales, reactivos y equipos no suministrados

PCR

1. Agua destilada
2. Pipetas electrónicas o mecánicas y puntas resistentes a aerosoles
3. Termociclador con tapa térmica
Estos kits fueron validados con de los siguientes termocicladores:
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ de Life Technologies™, termociclador Veriti™, Gene Amp® PCR System 9700 y Eppendorf Mastercycler® Pro.
El uso de otros termocicladores con estos kits requiere validación por parte del usuario.
4. Tubos de reacción para termociclado con paredes delgadas de 0,2 mL (8 tiras o 96 pocillos).
Usar los recomendados para cada termociclador.
5. Tubos estériles de 1,5 mL
6. Zona de trabajo estéril, como gabinete o cubierta de seguridad biológica.
7. Centrífuga de mesa con adaptadores para pocillos y capacidad para alcanzar 2500 x g
8. Vórtex

Electroforesis en gel de agarosa

9. Aparato de electroforesis en gel de agarosa
10. Gel TBE de agarosa al 1 % (para biología molecular) que contiene 0,1µg/mL de bromuro de etidio.
11. Tampón de carga
12. Marcador PCR apto para cubrir un rango de 300–1300 bp
13. Transiluminador de luz UV

Purificación del producto PCR

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® nro. de cat. 78200 para 100 reacciones o Illustra™ ExoProStar™ nro. de cat. US77702 para 100 reacciones)
15. 2mM MgCl₂ (disponible para su compra a CareDx Pty Ltd, código de producto MgCl2-1.0(50) o MgCl2-1.0(3000))
16. Agitador

El uso de técnicas de purificación de PCR alternativas requiere validación por parte del usuario antes de su uso.

Reacción de secuenciación

17. BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 o v1.1, Applied Biosystems™ de Life Technologies™.
18. 5 tampones de reacción de secuenciación (CareDx Pty Ltd, código de producto SEQ BUF-2.0(400) o SEQ BUF-2.0(5000)) o 5 tampones de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 o v1.1, Applied Biosystems™ de Life Technologies™.

Purificación de productos de la reacción de secuenciación

19. 125mM EDTA, pH 8,0 (disponible para su compra a CareDx Pty Ltd, código de producto EDTA-30(200) o EDTA-30(5000))
20. Etanol absoluto y al 80 %. Cada ejecución requiere etanol al 80 % recién preparado que consiste de etanol absoluto y agua destilada. NO USAR ETANOL DESNATURALIZADO (también denominado alcohol desnaturalizado en algunos países).

El uso de técnicas de purificación de secuenciación alternativas requiere validación por parte del usuario antes de su uso.

Desnaturalización y electroforesis de productos de la reacción de secuenciación

21. Formamida Hi-Di™, Applied Biosystems™ de Life Technologies™, código de producto 4311320
22. Secuenciador automatizado de ADN y accesorios (por ejemplo, ABI Prism® 3730 Applied Biosystems™ de Life Technologies™), incluidos recopilación de datos y software.

Estos kits fueron probados y validados en el software y los secuenciadores capilares 3100, 3730 y 3730xl Applied Biosystems™ de Life Technologies™.

El uso de otras técnicas de desnaturalización y plataformas de secuenciación requiere validación por parte del usuario antes de su uso.

23. Software de análisis de secuenciación de HLA (por ejemplo, ASSIGN™ SBT, versión 4.7 o superior, CareDx Pty Ltd).

Requisitos de muestreo

1. Agua destilada (control negativo/sin plantilla)
2. ADN genómico humano de alto peso molecular (rango de concentración de 20-100 ng/μL en un tampón Tris/EDTA y OD_{260/280} > 1,8) extraído de especímenes de sangre entera anticoagulada ACD o EDTA. NO usar especímenes de sangre entera que contengan heparina.

El método de aislamiento de ADN requiere validación por parte del usuario antes de su uso.



Advertencias y precauciones de seguridad

- Solo personal de laboratorio autorizado y capacitado debe usar este kit.
- Todas las muestras, los equipos y los reactivos deben manipularse de acuerdo con las prácticas recomendadas de laboratorio. En particular, todo el material de pacientes debe considerarse potencialmente infeccioso. Se recomienda especialmente usar guantes y batas de laboratorio. Hay que manipular y eliminar todo el material de muestras de acuerdo con las pautas regulatorias locales y nacionales.
- NINGUNO de los componentes de los kits contiene sustancias peligrosas.
- NO usar los reactivos más allá de su fecha de caducidad.
- NO se recomienda usar componentes de kits perteneciente a lotes diferentes. Este tipo de uso puede afectar al rendimiento del ensayo.
- NO se recomienda usar reactivos no incluidos en este kit o no mencionados en “Materiales, reactivos y equipos no suministrados” (por ejemplo, las polimerasas de ADN *Taq* alternativas). Este tipo de uso puede afectar al rendimiento del ensayo.
- Deben tomarse medidas para evitar la contaminación cruzada de especímenes de ADN. Se deben cambiar las puntas entre especímenes de ADN.
- Las actividades pre y pos PCR deben estar separadas físicamente de forma estricta. Hay que usar el equipo, los reactivos y las batas de laboratorio especialmente designados.
- El bromuro de etidio es un carcinógeno potencial. Siempre deben usarse guantes de protección al preparar y manipular geles. Se deben eliminar geles y tampones de bromuro de etidio de acuerdo con las pautas locales y nacionales.
- Al visualizar y fotografiar geles de agarosa bajo la luz UV, hay que evitar siempre la exposición directa, y usar protección para el rostro con bloqueo de UV, guantes desechables y batas de laboratorio.

Símbolos

Se han utilizado los siguientes símbolos no estándar:

Símbolo	Descripción
	Mezcla de PCR específica de locus
	ADN polimerasa
	Cebador de secuenciación directa del exón 1 de HLA-A Consultar “Composición del kit” y la Tabla 4 para conocer otros cebadores de secuenciación.
	Fecha de fabricación (requerida en mercados fuera de la UE).

Procedimiento

1. PCR

- 1.1. Deberá prepararse una reacción de PCR por separado para amplificar cada locus y para probar cada muestra individual. Cada ejecución debe incluir controles positivos adecuados de genotipos conocidos, y al menos un control negativo de cada locus que se amplifica.
- 1.2. Preparar una solución fresca de mezcla maestra de PCR cada vez que se realiza un PCR. Descongelar rápidamente la mezcla de PCR específica de locus a temperatura ambiente. Una vez descongelada, mezclar en vórtex brevemente.
- 1.3. Administrar el volumen requerido de mezcla de PCR y ADN polimerasa en un tubo estéril para la cantidad de muestras que se desean probar (consultar la Tabla 1 a continuación para conocer el volumen por reacción). Mezclar en vórtex a pulso la solución 3 o 4 veces.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Mezcla de PCR específica de locus por ejemplo, MEZCLA	16 µL	16 µL	16 µL	16,7 µL	16,7 µL	16,7 µL
ADN polimerasa por ejemplo, ADN POL – HLA-A	1 µL	1 µL	1 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL

Tabla 1: Composición de la mezcla maestra requerida por muestra.

- 1.4. Administrar 17 µL de la mezcla maestra en cada pocillo.
- 1.5. Añadir 3 µL de ADN de la muestra o los controles positivos adecuados a cada pocillo. Añadir 3 µL de agua destilada al pocillo de control negativo.
- 1.6. Sellar los pocillos. Mezclar suavemente en vórtex y centrifugar brevemente.
- 1.7. Colocar los pocillos en un termociclador y ejecutar de acuerdo con las condiciones de termociclado que se indican a continuación.

95 °C – 10 min
96 °C – 20 seg
60 °C – 30 seg
72 °C – 3 min
15 °C – retención

} 33 ciclos

- 1.8. La amplificación tarda aproximadamente 2,5 horas en completarse.
- 1.9. Cuando finaliza la PCR, quitar los pocillos/placas del termociclador y continuar directamente con la electroforesis en gel o almacenar 4 °C hasta que sea necesario.

NOTA: la purificación de amplicones mediante tratamiento ExoSAP debe producirse en las 24 posteriores a la finalización de la PCR.

2. Electroforesis en gel de agarosa

- 2.1. Confirmar la correcta amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa con 2 µL de cada producto de PCR mezclado con un tampón de carga de 5 µL (si se utilizan

volúmenes alternativos para el tampón de carga, deben validarse antes de su uso). Se recomienda usar geles de agarosa al 1 %.

2.2. La cantidad y los tamaños esperados de los amplicones resultantes variarán según el locus y el genotipo de la muestra. Los tamaños de amplicones de PCR esperados se detallan en la Tabla 2.

Locus	Tamaños de banda esperados	
HLA-A	≈ 2 kbp	
HLA-B	≈ 2 kbp	
HLA-C	≈ 1,1 kbp y 1,4 kbp	
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850 bp	(HH-PD5.2-5)
	≈ 630 bp - 980 bp	(LG-PD5.2-7)
	El patrón de bandas variará según la presencia de grupos de alelos específicos	
HLA-DQB1	≈ 300 bp y 500 bp	(PQ-PD6.2-2)
	≈ 400 bp y 500 bp	(AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp	(HH-PD10.1)
	≈400 bp, ≈780 bp y ≈1470 bp (KD-PD10.2-1)	

Tabla 2: tamaños de productos esperados para cada ensayo.

3. Purificación del producto PCR

NOTA: pueden usarse otros sistemas de purificación además de ExoSAP-IT® o ExoProStar™ (por ejemplo, Agencourt® AMPure® XP o sistemas basados en columnas) para purificar productos de PCR. Se recomienda especialmente que los usuarios validen estos procedimientos antes de continuar. Si se utiliza un tratamiento ExoSAP, se recomienda que los usuarios sigan el procedimiento que se describe a continuación.

3.1. Preparar una mezcla maestra que consiste en 4 µL de ExoSAP-IT® o ExoProStar™ y 8 µL de 2mM MgCl₂ por muestra a purificar. Mezclar en vórtex suavemente. Administrar 12 µL de la mezcla maestra en el pocillo de cada muestra reactiva. Sellar los pocillos, mezclar en vórtex y colocar en un agitador o mezclar en vórtex suavemente durante 2 minutos. Centrifugar brevemente antes de colocar en el termociclador. Ejecutar el termociclador de acuerdo con el siguiente perfil:

37 °C – 30 min
80 °C – 15 min
4 °C – retención

3.2. Al finalizar, diluir el producto purificado en una proporción 1:4 con agua destilada. Este paso de dilución garantizará que haya suficiente plantilla para realizar las reacciones de secuenciación, y garantizará que la concentración de la plantilla sea suficiente para producir datos de secuencia de buena calidad.

NOTA: es posible que se requiera un factor de dilución más alto (por ejemplo, 1:8) si se observan señales altas uniformes junto con ruido y artefactos asociados. Es posible que los productos de PCR más débiles requieran un factor de dilución más bajo.

3.3. Las muestra tratadas con ExoSAP pueden almacenarse a 4 °C hasta que estén listas para su uso. Estas muestras pueden almacenarse a 4 °C durante una semana como máximo antes de su uso, pero deben almacenarse a -20 °C si se las va a utilizar a largo plazo⁹.

4. Reacción de secuenciación

NOTA: en casos donde las ambigüedades heterocigóticas se resuelvan con cebadores de secuenciación heterocigóticos como HARPS[®], consultar las instrucciones de uso de OLERUP SBT™ HARPS[®].

4.1. En la Tabla 3 se indican los cebadores de secuenciación que deben usarse para cada locus.

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
AEX1F	AEX1R	BEX1F	BEX2F	CEX1F	CEX1R
AEX2F	AEX2R	BEX2R	BEX3F	CEX2F	CEX2R
AEX3F	AEX3R	BEX3R	BEX4F	CEX3F	CEX3R
AEX4F	AEX4R	BEX4R		CEX4F	CEX4R
				CEX5F	CEX5R
				CEX6F	CEX6R
				CEX7F	

HLA-DRB1 [†]		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2 [^]	RB-TG344-R [†]	DQB1EX3F	DQB1EX3R		
O		O		O	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R-3	DPB1EX1F	DPB1EX1R
DRB1EX3F-7	DRB1EX3R-7	DQB1EX3F	DQB1EX3R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
RB-TG344-R [†]				DPB1EX3F	DPB1EX3R
				DPB1EX4F	DPB1EX4R
				DPB1EX5F	DPB1EX5R
				PB-AG341-R [*]	

Tabla 3: cebadores de secuenciación proporcionados para usar con cada locus.

[†]RB-TG344-R es un HARP[®] dirigido al diformismo del codón 86. Su uso es opcional.

^{*}PB-AG341-R es un HARP[®] dirigido al dimorfismo del codón 85 en DPB1. Su uso también es opcional.

[^]DRB1EX3R-2 es un cebador de secuenciación DRB1 en los kits HH-PD5.2-5 que tiene un comportamiento similar a un HARP y está diseñado para secuenciar los siguientes grupos de alelos: *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 y *16. Este cebador producirá datos de secuenciación

heterocigóticos, homocigóticos o ningún dato de secuenciación, según el genotipo de la muestra que se tipifique. Al analizar datos de DRB1EX3R-2 en ASSIGN™ contra la referencia de DRB1-FullX2, los datos del exón 3 resultantes se analizarán en una capa por separado y permitirán la resolución de una serie de ambigüedades de alelos en el exón 3, como la ambigüedad DRB1*14:01 versus *14:54. Su uso es opcional, en función de la estrategia de tipificación que utilice el laboratorio. Esto no se aplica a los kits LG-PD5.2-7, ya que la secuenciación direccional para el exón 3 está disponible.

4.2. Preparar una solución fresca de mezcla de cebador de secuenciación cada vez que se realiza un reacción de secuenciación. La composición y los volúmenes de la mezcla indicados a continuación son **por muestra**.

Componente	Volumen
Cebador de secuenciación	2 µL
Agua destilada	11,5 µL
Varios BigDye® Terminator	1 µL
5x Seq Rxn Buffer	3,5 µL

4.3. Mezclar suavemente en un vórtex a pulso cada mezcla de reacción de secuenciación.

4.4. Administrar 18 µL de la mezcla de reacción de secuenciación en cada pocillo correspondiente.

NOTA: para ejecuciones que incluyan pocas muestras con muchos cebadores de secuenciación, es aceptable administrar el cebador de secuenciación (2 µL) directamente en los pocillos individuales. A continuación, puede crearse una mezcla maestra compuesta de agua destilada, varios BigDye® Terminator y 5x Seq Rxn Buffer, de la cual debe administrarse 16 µL en cada pocillo. Se recomienda especialmente que el usuario valide el uso de este procedimiento alternativo antes de su implementación.

4.5. Añada 2 µL del producto de PCR purificado a cada pocillo correspondiente.

NOTA: deben tomarse medidas para evitar la contaminación cruzada de reacciones de secuenciación.

4.6. Sellar los pocillos, mezclar suavemente y centrifugar brevemente para garantizar que el contenido se ubique en la base de cada pocillo.

4.7. Colocar los pocillos en un termociclador y ejecutar de acuerdo con el siguiente perfil:

Cantidad de ciclos	Temperatura y tiempo
25	96 °C – 10 seg 50 °C – 5 seg 60 °C – 2 min
1	4 °C – retención

4.8. Cuando finaliza el programa, quitar los pocillos/placas del termociclador y continuar directamente con la purificación de los productos de la reacción o almacenar a oscuras a 4 °C hasta que sea necesario. Se recomienda purificar las muestras y ejecutar el secuenciador de ADN en las 24 horas posteriores.

5. Purificación de productos de la reacción de secuenciación

NOTA: la purificación de los productos de la reacción puede llevarse a cabo con procedimientos distintos al método de precipitación de etanol que se describe aquí. Se recomienda especialmente que los usuarios validen estos procedimientos antes de continuar.

- 5.1. Centrifugar brevemente los pocillos/placas antes de continuar. Si se han usado cubiertas/tapas reutilizables durante el termociclado, etiquete las cubiertas/tapas para evitar la contaminación cruzada.
- 5.2. Retirar con cuidado los sellos.
- 5.3. Añada 5 μL de 125mM EDTA, pH 8,0 en cada pocillo. Asegurarse de que el EDTA llegue a la base del pocillo.
- 5.4. Añadir 60 μL de etanol al 100 % en cada pocillo. Sellar los pocillos/placas y mezclar en vórtex de forma breve pero a conciencia para garantizar un mezclado correcto.
- 5.5. Sedimente los productos de extensión mediante un centrifugado a 2000 g durante 45 minutos. **CONTINÚE DE INMEDIATO CON EL PASO SIGUIENTE.** Si no es posible, volver a centrifugar 10 minutos más antes de continuar.
- 5.6. Retirar los sellos de los pocillos y, para desechar el sobrenadante, invertir los pocillos en toallas o pañuelos de papel.
- 5.7. Colocar los pocillos invertidos y las toallas o los pañuelos de papel en la centrífuga. Centrifugar a 350 g durante 1 minuto para eliminar todo el sobrenadante residual.
- 5.8. Retirar los pocillos de la centrífuga y colocarlos en posición vertical sobre la mesa de trabajo. Desechar las toallas o los pañuelos de papel.
- 5.9. Preparar solución fresca de etanol al 80 % con etanol absoluto y agua destilada.
- 5.10. Añadir 60 μL de etanol al 80% en cada pocillo. Volver a sellar los pocillos y mezclar en vórtex brevemente.
- 5.11. Dar un pulso de centrífuga a 2000 g durante 5 minutos.
- 5.12. Repetir los pasos 5.6 y 5.7.
- 5.13. Retirar los pocillos de la centrífuga y desechar las toallas de papel. Volver a sellar los pocillos y continuar con el paso de desnaturalización. De lo contrario, almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a oscuras¹⁰. Se recomienda ejecutar los productos de extensión en el secuenciador de ADN en las 24 horas posteriores a la preparación de las reacciones de secuenciación.

6. Desnaturalización y electroforesis de productos de la reacción de secuenciación

NOTA: si se ha utilizado otro método de purificación distinto en lugar de la precipitación de etanol, es posible que no sea necesario realizar el procedimiento para la desnaturalización de los productos de extensión en formamida Hi-Di™ que se describe aquí. Se recomienda especialmente que los usuarios validen los procedimientos alternativos antes de continuar.

- 6.1. Añadir 12 µL de formamida Hi-Di™ en cada pocillo. Mezclar en vórtex y centrifugar brevemente los pocillos/placas.
- 6.2. Incubar los pocillos a 98 °C durante 5 minutos. Después de la incubación, asegurarse de enfriar rápidamente los pocillos a temperatura ambiente (por ejemplo, poniéndolos en hielo o usando el termociclador para realizar los pasos de desnaturalización y enfriamiento) antes de colocarlos en el secuenciador. Después de resuspender la muestra en formamida Hi-Di, se recomienda cargarla inmediatamente en el instrumento. La muestra permanecerá estable durante 24 horas en el instrumento⁸.

NOTA: asegurarse de que no haya burbujas de aire en los pocillos. Estas burbujas pueden ingresar en el capilar y dañarlo.

- 6.3. Cargar los pocillos/placas en el secuenciador automático y preparar el archivo de recopilación de datos según las especificaciones del fabricante del secuenciador.
- 6.4. Se han validado los siguientes parámetros del instrumento con Big Dye® Terminator Sequencing Kit v3.1 y POP-7™. Es posible que estos parámetros requieran validación del usuario para otros polímeros, métodos químicos de secuenciación e instrumentos. Consultar el manual del usuario del instrumento correspondiente para acceder a instrucciones y guías detalladas (por ejemplo, asegurarse de que la configuración del conjunto de tinciones sea adecuada para el método químico utilizado; por caso, el método de secuenciación v1.1 Big Dye® Terminator requerirá otro conjunto de tinciones).

Parámetro	Configuración
Conjunto de tinciones	Z_BigDyeV3
Archivo de Mobility	KB_3730_POP7_BDTV3
Llamador de bases	KB.bcp
Módulo de ejecución	FastSeq50_POP7 regular
Tiempo de inyección	15 seg
Tiempo de ejecución	3000 seg

- 6.5. Utilizar el software de recopilación de datos del instrumento para procesar los datos en bruto y crear los archivos de secuenciación. Consultar el manual del usuario del instrumento correspondiente para acceder a instrucciones y guías detalladas.

7. Edición y análisis de electroferogramas

Los kits OLERUP SBT™ se diseñan, desarrollan y validan con el software OLERUP ASSIGN™ SBT de CareDx Pty Ltd. Se recomienda que los usuarios utilicen las versiones 3.6+ o posteriores de ASSIGN™ SBT (ASSIGN™ SBT V4.7 o OLERUP ASSIGN™ SBT V471), ya que estas versiones del software aplican archivos de configuración y referencia diseñados específicamente para los kits de tipificación OLERUP SBT™ y para HARPS®. Para obtener más detalles sobre la operación de estos programas de software, consultar los manuales del

usuario correspondientes, que pueden descargarse en el sitio web de CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Los datos de tipificación basados en secuenciación generados con los kits de tipificación OLERUP SBT™ deben analizarse contra los siguientes archivos de referencia de ASSIGN™ SBT proporcionados por CareDx Pty Ltd:

Ensayo	Código de producto	Archivo de referencia de ASSIGN
OLERUP SBT™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
OLERUP SBT™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml o Cw.xml
OLERUP SBT™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

Características de funcionamiento

Precisión

Los paneles con un máximo de 93 muestras del Programa de ensayos de aptitud UCLA International DNA Exchange (2008-2010) utilizados para pruebas internas de los kits OLERUP SBT™ ofrecieron los siguientes resultados:

Locus	Cantidad de muestras sometidas a prueba	Sensibilidad de diagnóstico (% de PCR exitosos)	Especificidad de diagnóstico (% de genotipos obtenidos)	Cantidad de muestras discordantes	Cantidad de muestras heterocigóticas	Cantidad de alelos únicos
HLA-A	81	100 %	100 %	0	74	20
HLA-B	82	100 %	98,8 %	0	79	81
HLA-C	39	97,5 %	97,5 %	0	35	21
HLA-DRB1	93	96,7 %	96,7 %	0	84	39
HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2)	42	100 %	100 %	0	36	14
HLA-DQB1 (AN-PD6.2-3)	38	100 %	100 %	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100 %	100 %	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10.2-1)	16	100 %	100 %	2*	14	13

*Las dos muestras discordantes contenían información de secuenciación adicional más allá del exón 2. El Programa de ensayos de aptitud UCLA International DNA Exchange no reportó esta información. Una muestra contenía 131:01, pero el Programa de ensayos de aptitud UCLA International DNA Exchange reportó 13:01. Los alelos difirieron en los exones 3 y 4. La otra muestra contenía 107:01, pero el Programa de ensayos de aptitud UCLA International DNA Exchange reportó 13:01. Estos alelos difirieron en el exón 1.

Para los kits OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (código de producto LG-PD5.2-7), se utilizó un panel de 23 muestras caracterizadas en pocillos que cubrían una amplia gama de alelos para las pruebas internas. Además, también se tipificó un panel de 293 muestras de fuentes externas sin conocimiento *a priori* de otros datos de tipificación de HLA. Estas muestras también se sometieron a pruebas con el ensayo OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). En los casos donde se obtuvo un resultado heterocigótico, se examinaron las asociaciones DQB1/ DRB1 para esas muestras para confirmar el resultado y para detectar instancias donde puedan haberse producido alelos nulos.

Las pruebas ofrecieron los siguientes resultados:

Locus	Cantidad de muestras sometidas a prueba	Sensibilidad de diagnóstico	Especificidad de diagnóstico	Cantidad de muestras discordantes	Cantidad de muestras heterocigóticas	Cantidad de alelos únicos
HLA-DRB1	23	100 %	100 %	0	23	12
	286*	97,9 %	99,6 %	0	253	33

*Seis muestras no se amplificaron debido a la mala calidad de las muestras de ADN. Se detectó que una de las muestras contenía ADN contaminado, cuyo origen estuvo en el laboratorio en el cual se obtuvieron las muestras. A causa de la contaminación, no se pudo obtener un genotipo para esa muestra.

El análisis de secuenciación de PCR y de lugares de cebado de secuenciación, y los estudios de evaluación de rendimiento no han identificado ningún alelo común y bien documentado que no se haya amplificado con el uso recomendado de estos kits. Para obtener más información, consultar el documento *OLERUP SBT™ Primer Analysis*, disponible junto con cada publicación de referencia de OLERUP ASSIGN™ SBT, que puede descargarse del sitio web de CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Límite de detección

La concentración recomendada de ADN genómico humano de alto peso molecular es de 20-100 ng/μL. Las pruebas internas han demostrado que también pueden usarse muestras con una concentración baja (hasta 5 ng/μL). También se obtuvieron genotipos correctos desde ADN de baja calidad o fragmentado.

Especificidad

Los kits OLERUP SBT™ de CareDx Pty Ltd son ensayos de locus específicos. Si se usan los kits de acuerdo con estas instrucciones, solo debería amplificarse un solo locus. En la mayoría de los casos, el uso de los cebadores de secuenciación incorporados en cada kit producirá una tipificación de HLA para la mayoría de las muestras, sin necesidad de otras resoluciones. En los casos donde siga habiendo ambigüedades heterocigóticas, se recomienda usar cebadores de secuenciación de resolución (como OLERUP SBT™ HARPS®).

Debe señalarse que es posible que se produzcan mutaciones en los lugares de amplificación o cebado de secuenciación, y que eso puede producir alelos nulos. Las muestras que sugieran un resultado de tipificación homocigótica deben confirmarse mediante procedimientos alternativos.

Sustancias interferentes

CareDx Pty Ltd ha identificado todas las potenciales sustancias interferentes que puede afectar la prueba. Consultar la tabla a continuación.

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
EDTA	Tampón TE, tubos de recolección de sangre	Muy bajo	Resuspender el ADN en Tris-HCl pH8 o TE con <1mM EDTA. Usar kits de preparación de ADN en sangre comerciales y/o evitar los tubos de recolección de sangre para EDTA

Inhibidor	Fuente potencial	Riesgo	Comentarios
Alcoholes	Etanol, isopropanol, alcohol isoamílico	Bajo	Asegurarse que los pellets o las perlas de ADN se sequen al aire, e inspeccionar visualmente para detectar gotas de etanol (etanol al 1 % = 1,25 µL de etanol al 80 % en una reacción de PCR de 100 µL).
Exceso de sales	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Muy bajo	Garantizar un lavado a conciencia de los pellets o las perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 230/260 ~2
Sales caotrópicas	Cloruro de guanidinio; MgCL ₂ ; urea	Muy bajo	Garantizar un lavado a conciencia de los pellets o las perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 230/260 ~2
Fenol: cloroformo	Remanente orgánico	Muy bajo	Un componente del procedimiento de extracción de ADN Trizol de amplio uso comercial. Garantizar un lavado a conciencia de los pellets o las perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 230/260 ~2
Proteínas	BSA, PEG, albúmina en sangre	Muy bajo	Kits de preparación de ADN en sangre comerciales. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 260/280 >1,8
Hemo, hemoglobina, inmunoglobulinas	Sangre	Muy bajo	Evitar el uso de muestras de sangre que evidencien una hemólisis intensa. Kits de preparación de ADN en sangre comerciales. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 260/280 >1,8
Detergentes/DDT	Desoxicolato de sodio, sarcosil, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octil glucósido	Muy bajo	Garantizar un lavado a conciencia de los pellets o las perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 230/260 ~2
Proteasas	Proteinasa K, manipulación de muestras	Muy bajo	Usar kits de preparación de ADN en sangre o saliva comerciales. Usar guantes en todo momento
Nucleasas	Manipulación de muestras, enzimas de restricción, nucleasa microcócica	Muy bajo	Kits de preparación de ADN en sangre comerciales. Usar guantes en todo momento
ADN/ARN exógeno	Remanente, contaminación	Muy bajo	Preparar el ADN genómico en un área pre PCR exclusiva
Portadores	ARN, heparina, glucógeno	Muy bajo	Usar kits de preparación de ADN en sangre comerciales y/o evitar los tubos de recolección de sangre para heparina
Exceso de iones metálicos	Mg ²⁺ del tampón de PCR, iones de hierro	Muy bajo	Garantizar un lavado a conciencia de los pellets o las perlas de ADN con etanol al 80 %. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 230/260 ~2
Fármacos antivirales (por ejemplo, aciclovir)	Sangre	Muy bajo	Kits de preparación de ADN en sangre comerciales. Asegurar un ADN genómico inicial con OD 260/280 >1,8
Polvo en los guantes	Guantes con polvo	Muy bajo	Usar guantes sin polvo
Tubos de PCR irradiados con luz UV	Tratamiento con luz UV de los tubos PCR	Muy bajo	Evitar el tratamiento de utensilios plásticos

Limitaciones y precauciones

- Se recomienda especialmente que el usuario valide estos kits antes de su implementación en el laboratorio con muestras cuya tipificación de HLA haya sido determinada a través de otros procedimientos moleculares. En particular, el usuario debe validar todas las desviaciones respecto de este procedimiento (por ejemplo, el uso de procedimientos de purificación de secuenciación de PCR o ADN alternativos) antes de su implementación.
- Estos kits se validaron con paneles de muestras cuyos genotipos cubren una amplia gama de alelos. Sin embargo, debe señalarse que pueden encontrarse alelos poco frecuentes y alelos con polimorfismos en lugares de amplificación y cebado de secuenciación, que no deben amplificarse ni secuenciarse.
- La naturaleza de la tipificación basada en secuenciación de HLA impone que todos los factores que no pertenezcan a la mezcla de PCR pueden producir una amplificación preferencial o alelos nulos. De este modo, los resultados de tipificaciones aparentemente homocigóticas deben confirmarse a través de métodos alternativos y/o genotipificación familiar.
- Debe incluirse un control positivo (ADN humano) y un control negativo (agua destilada) en cada ejecución de PCR. El control positivo debe producir un producto de PCR del tamaño adecuado en función del locus amplificado, y la secuencia resultante debe estar de acuerdo con el genotipo de la muestra. No debe haber productos de PCR en el control de plantilla negativo para cada experimento. Si hay una banda evidente, es posible que se haya producido contaminación en algún nivel y debe repetirse la ejecución.
- En ocasiones, es posible que haya evidencias de productos de PCR adicionales y más débiles. Estas bandas adicionales no interfieren con los resultados de la secuencia o la calidad.

Licencia

Los kits OLERUP SBT™ contienen polimerasa GoTaq® Hot Start (ADN POL), que fabrica Promega Corporation y distribuye CareDx Pty Ltd. Licenciado a Promega bajo los números de patente 5,338,671 y 5,587,287 de los Estados Unidos y sus patentes extranjeras correspondientes.

Bibliografía

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors*. Tissue Antigens **57**: 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5*. Tissue Antigens **63**: 412-423.
3. *ASSIGN™ SBT v3.6+ Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
6. Puede encontrar más información sobre el Programa UCLA DNA Exchange en: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Puede encontrar los alelos de HLA actuales en <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Sitio web de Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs> , ID de respuesta: E15311)
9. Current Protocols in Molecular Biology (2001)3, Unit 15.2.5
10. Sitio web de Thermo Fisher <https://www.thermofisher.com/au/en/home/technical-resources/technical-reference-library/capillary-electrophoresis-applications-support-center/sanger-sequencing-support/sanger-sequencing-support-getting-started.html>
11. Gillio-Meina C, Cepinkas G, Cecchini EL., Fraser DD, *Translational Research in Pediatrics II: Blood Collection, Processing, Shipping, and Storage*, Pediatrics, April 2013, **131**, 4.
12. Sidstedt M *et al*, (2018): *Inhibition mechanisms of haemoglobin G, and whole blood in digital and real-time PCR*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **410**, 2569-2583.
13. Schraider C *et al*. (2012): *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*, Journal of Applied Microbiology, **113**, 1014-1026.
14. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*. 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (consultar también las citas que se incluyen)
15. Demeke T, Jenkins GR. *Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits*. Anal Bioanal Chem. 2009 396:1977-90.
16. Wilson IG. *Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification*. 1997 Appl Environ Micro. 63:3741-51 (consultar también las citas que se incluyen)
17. Al-Soud WA, Rådström P. *Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples*. Appl Environ Micro. 1998 64:3748-53
18. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. *Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR*. Anal Bioanal Chem. 2018 410:2569-83
19. Al-Soud WA, Rådström P. *Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells*. J Clin Micro. 2001 39:485-93
20. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. *Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus*. Transplantation. 1996 27;62(2):238-42
21. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. *False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder*. Transfusion. 1992 32:83-5.
22. Burgess LC, Hall JO. *UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR*. Biotechniques. 1999 27:252-57.
23. Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. *Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects*. Genome Res. 2014 24:2033-44
24. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. *Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding*. Nucl Acid Res. 2006 34:2920-34.
25. *CareDx cfDNA Interfering Substances report 2018*

Resolución de problemas

Problema	Causas posibles	Solución
Ausencia o debilidad del producto de PCR	ADN de mala calidad	Evaluar la calidad del ADN a través de una electroforesis en gel. El ADN intacto debe ser aproximadamente de 3 kb, con nada o poca evidencia de frotis sobre el gel. Volver a extraer el ADN y repetir la PCR si es posible.
	Cantidad insuficiente de ADN añadida a la PCR.	Comprobar si la concentración de ADN está entre 20-100 ng/μL. Volver a extraer el ADN y repetir la PCR si es posible.
	Presencia de inhibidores de PCR en el ADN genómico	Los inhibidores de PCR están presentes en todos los fluidos del cuerpo humano, entre ellos la sangre, el suero y el plasma. Los inhibidores de PCR representan un grupo diverso de sustancias con diferentes propiedades y mecanismos de acción. Los inhibidores más comunes en la sangre son la hemoglobina, la inmunoglobulina G (IgG) y la lactoferrina. Además, las hormonas o las sustancias antivirales como el aciclovir, y también algunos antibióticos, pueden afectar a la amplificación de genes ^{12,13} . Evitar el uso de especímenes de sangre entera que contengan heparina. Para acceder a detalles más específicos, consultar los manuscritos citados ^{12,13} . EDTA: puede alterar las concentraciones de Mg ²⁺ y puede inhibir el ADN polimerasa en ciertas concentraciones ¹³ . Por lo general, los tubos de citrato de sodio dan como resultado ADN de alta calidad ¹¹ . Los métodos de extracción/purificación de ADN pueden eliminar de manera eficiente los inhibidores de PCR. El cliente debe evaluar los métodos de extracción/purificación de ADN para garantizar la pureza de la muestra. Volver a extraer el ADN y repetir la PCR si es posible.
	ADN polimerasa no añadido a la mezcla maestra o mezcla insuficiente de la mezcla maestra antes de añadir las muestras.	Repetir la PCR. Asegurarse de añadir y mezclar en vórtex lo suficiente los componentes de la mezcla maestra.
	Problemas en el termociclado	Comprobar los parámetros de ejecución del termociclado. Comprobar el historial de ejecuciones para asegurarse de que no se finalizó prematuramente esa ejecución. Asegurarse de que el termociclador esté funcionando de acuerdo con las especificaciones del fabricante y que se someta a un mantenimiento regular.
	No se añadió	Sumergir el gel en un baño de tinción que contenga

	bromuro de etidio al gel.	1X TBE con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio. Desteñir en 1X TBE antes de tomar la imagen del gel. Asegurarse de añadir bromuro de etidio al gel antes de verterlo.
	Las muestras de ADN están eluidas o diluidas en agua que puede tener un pH ligeramente ácido.	Siempre que sea posible, usar agua destilada con pH neutro.
Ausencia o debilidad del producto de PCR para la banda de exones 3-5 en el ensayo KD-PD10.2-1	ADN de mala calidad	La amplificación de muestras de calidad muy baja puede producir una amplificación débil del amplicón del exón 3-5. De todos modos, puede lograrse la tipificación con los datos de secuenciación de los exones 1 y 2. O bien puede volverse a extraer el ADN y repetir la PCR si es posible.
Tamaños de banda incorrectos	Se utilizó el kit incorrecto	Comprobar que se haya utilizado el kit adecuado.
	Se utilizó el programa de termociclado incorrecto.	Comprobar los parámetros del termociclado.
	Contaminación de la PCR	Verificar el control negativo para detectar evidencias de contaminación. Descontaminar el área de trabajo y repetir la PCR. Repetir el PCR para identificar la fuente de contaminación. Considerar el uso de un kit nuevo. Si el ADN genómico de una muestra parece estar contaminado, volver a extraerlo o recurrir a una fuente alternativa de ADN.
Intensidad de señal débil de los electroferogramas	Debilidad del producto de PCR	Comprobar la imagen del gel. NO se recomienda la secuenciación de bandas de PCR débiles, ya que la calidad de la secuencia puede ser insuficiente para SBT. Considerar el uso de un factor de dilución más bajo (por ejemplo, 1:2, 1:3) después de la purificación de PCR.
	Productos de reacción insuficientes aplicados al secuenciador	Verificar los parámetros del secuenciador. Es posible que deban aumentarse el tiempo de inyección y el voltaje.
	Problemas durante la purificación de productos del secuenciador	Tener mucho cuidado al descartar el sobrenadante, ya que puede expulsar el pellet.
La intensidad de la señal es demasiado alta (presencia de picos [artefactos] fluorescentes altos)	Demasiado producto de PCR	Comprobar la imagen del gel. Considerar el uso de un factor de dilución más alto después de la purificación de PCR. Verificar la cantidad de ADN polimerasa utilizado en el PCR.
	Se aplicaron	Verificar los parámetros del instrumento.

	demasiados productos de reacción al secuenciador.	Considerar la reducción del tiempo de inyección y el voltaje.
Línea de referencia con ruido (de fondo alto)	Contaminación del producto de PCR	Consultar las acciones correctivas mencionadas arriba.
	Amplificación de genes de HLA estrechamente relacionados	Comprobar los parámetros de termociclado.
	Mala purificación de la PCR	Asegurarse de que el tratamiento ExoSAP se realiza según las instrucciones del usuario del kit. Asegurar que la mezcla de PCR se combine a conciencia con ExoSAP Considerar el uso de ExoSAP, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante (aumentando la cantidad de enzima), o bien considerar una técnica de purificación alternativa.
	Reacciones de secuenciación contaminadas	Asegurarse de realizar todos los pasos para evitar la contaminación cruzada. Cambiar de puntas de pipetas si es posible. Añadir líquidos en la parte superior de los pocillos. Evitar los aerosoles.
	Cebador de secuenciación contaminado	Comprobar la calidad de la secuencia en los otros cebadores de secuenciación y de otras muestras en el mismo cebador. Considerar el uso de una alícuota nueva del cebador de secuenciación.
	Mezcla del terminador de tinción o tampón de secuenciación contaminados	Repetir la secuenciación con una alícuota nueva de reactivos.
	Mala purificación de los productos de secuenciación.	Repetir la secuenciación y garantizar que la purificación se realice de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
Presencia de burbujas de tinte	Mala purificación de los productos de secuenciación	Purificar los productos de acuerdo con las instrucciones del kit. Garantizar que los productos se laven lo suficiente con etanol al 80 %.

Productos relacionados

IVD con marca CE:

ASSIGN™ SBT 3.6+ Código de producto: CGX0036+

ASSIGN™ SBT v4.7 Código de producto: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Código de producto: CGX00471

OLERUP SBT™ HARPS®

Para acceder a la lista de productos completa, consultar las instrucciones de uso de OLERUP SBT™ HARPS®

Solo para uso de investigación:

Kits de tipificación de HLA OLERUP SBT™

AN-PD11.0-0(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-DRB3 (20 y 50 pruebas)

AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-DRB4 (20 y 50 pruebas)

AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-DRB5 (20 y 50 pruebas)

AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-B57 (20 y 50 pruebas)

LC-PD2.9(50)

Nota: los productos mencionados arriba están licenciados como IVD en Australia

Reactivos de laboratorio de uso general

MgCl₂ – 1.0(50) 2mM MgCl₂

MgCl₂ – 1.0(3000)

SEQ BUF – 2.0(400) 5x Seq Rxn Buffer

SEQ BUF – 2.0(5000)

EDTA – 3.0(200) 125mM EDTA, pH 8,0

EDTA – 3.0(5000)

Para obtener más detalles, contactar con el distribuidor local.



Kits autocertificados:

HH-PD3.2-2(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-C (20 y 50 pruebas)

HH-PD3.2-2(50)

PQ-PD6.2-2(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (20 y 50 pruebas)

PQ-PD6.2-2(50)

AN-PD6.2-3(20)
AN-PD6.2-3(50)
HH-PD10.1(20) Kit OLERUP SBT™ HLA-DPB1 (20 y 50 pruebas)
HH-PD10.1(50)
KD-PD10.2-1(20)
KD-PD10.2-1(50)

Información de contacto

Fabricante

CareDx Pty Ltd
PO Box 1294
Fremantle 6959
Australia Occidental
Australia
Tel: +61-08-9336-4212
Correo electrónico: [orders-aus@caredx.com](mailto:orders-aus@ caredx.com)
Sitio web: www.CareDx.com

Para acceder a soporte y detalles para realizar pedidos, consultar el sitio web de CareDx (<http://www.caredx.com>).